

特許協力条約

PCT

特許性に関する国際予備報告（特許協力条約第二章）

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 27 JAN 2005

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 F S O 4 - 4 0 8 P C T	今後の手続きについては、様式PCT/IPEA/416を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP2004/002238	国際出願日 (日.月.年) 25.02.2004	優先日 (日.月.年) 26.02.2003
国際特許分類 (IPC) Int.Cl. 'C07K14/47, C12N15/12, A61K37/02, A61P35/00		
出願人 (氏名又は名称) 独立行政法人 科学技術振興機構		

1. この報告書は、PCT35条に基づきこの国際予備審査機関で作成された国際予備審査報告である。
法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 6 ページからなる。

3. この報告には次の附属物件も添付されている。

a 附属書類は全部で 4 ページである。

振正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関が認めた訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面の用紙 (PCT規則70.16及び実施細則第607号参照)

第I欄4. 及び補充欄に示したように、出願における国際出願の開示の範囲を超えた補正を含むものとこの国際予備審査機関が認定した差替え用紙

b 電子媒体は全部で ディスク 1枚 (電子媒体の種類、数を示す)。
配列表に関する補充欄に示すように、コンピュータ読み取り可能な形式による配列表又は配列表に関連するデータを含む。 (実施細則第802号参照)

4. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

第I欄 国際予備審査報告の基礎
 第II欄 優先権
 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 第IV欄 発明の単一性の欠如
 第V欄 PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 第VI欄 ある種の引用文献
 第VII欄 国際出願の不備
 第VIII欄 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.05.2004	国際予備審査報告を作成した日 13.01.2005
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 晴絵 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

第I欄 報告の基礎

1. この国際予備審査報告は、下記に示す場合を除くほか、国際出願の言語を基礎とした。

- この報告は、_____語による翻訳文を基礎とした。
それは、次の目的で提出された翻訳文の言語である。
- PCT規則12.3及び23.1(b)にいう国際調査
 - PCT規則12.4にいう国際公開
 - PCT規則55.2又は55.3にいう国際予備審査

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。)

- 出願時の国際出願書類

明細書

第	1-5, 7, 10	ページ	出願時に提出されたもの
第	6, 8, 9	ページ*	18.05.2004 付けて国際予備審査機関が受理したもの
第		ページ*	付けて国際予備審査機関が受理したもの

請求の範囲

第		項	出願時に提出されたもの
第		項*	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
第	1-3, 5-7	項*	18.05.2004 付けて国際予備審査機関が受理したもの
第		項*	付けて国際予備審査機関が受理したもの

図面

第	1-7	ページ/図	出願時に提出されたもの
第		ページ/図*	付けて国際予備審査機関が受理したもの
第		ページ/図*	付けて国際予備審査機関が受理したもの

配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3. 表記により、下記の書類が削除された。

<input type="checkbox"/> 明細書	第		ページ
<input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲	第	4	項
<input type="checkbox"/> 図面	第		ページ/図
<input type="checkbox"/> 配列表(具体的に記載すること)			
<input type="checkbox"/> 配列表に関連するテーブル(具体的に記載すること)			

4. この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

<input type="checkbox"/> 明細書	第		ページ
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第		項
<input type="checkbox"/> 図面	第		ページ/図
<input type="checkbox"/> 配列表(具体的に記載すること)			
<input type="checkbox"/> 配列表に関連するテーブル(具体的に記載すること)			

* 4. に該当する場合、その用紙に "superseded" と記入されることがある。

第三欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

 国際出願全体 請求の範囲 5-7

理由:

この国際出願又は請求の範囲 5-7 は、国際予備審査をすることを要しない
次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 5-7 は、癌の治療法に関するものであって、人の身体の手術または
治療による処置及び診断方法に該当し、この国際予備審査機関が国際予備審査をす
ることを要しない対象に係るものである。

明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 _____ の
記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

全部の請求の範囲又は請求の範囲 _____ が、明細書による十分な
裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

請求の範囲 _____ について、国際調査報告が作成されていない。

ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が、実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のため
のガイドライン）に定める基準を、次の点で満たしていない。

書面による配列表が

- 提出されていない。
 所定の基準を満たしていない。
 提出されていない。
 所定の基準を満たしていない。

コンピュータ読み取り可能な形式による配列表が

コンピュータ読み取り可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表に関連するテーブルが、実施細則の附属書
Cの2に定める技術的な要件を、次の点で満たしていない。

- 提出されていない。
 所定の技術的な要件を満たしていない。

詳細については補充欄を参照すること。

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲 請求の範囲	1 - 3	有無
進歩性 (I S)	請求の範囲 請求の範囲	1 - 3	有無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲 請求の範囲	1 - 3	有無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1：荒川博文 他, 転写因子 p53 によって制御される遺伝子群, 細胞工学, 2002. 12. 22, Vol. 22, No. 1, 2003, p. 23-28

文献2：田矢洋一, p53のリン酸化とアセチル化による細胞機能の制御, 細胞工学, 2002. 12. 22, Vol. 22, No. 1, 2003, p. 29-33

文献3：S. SHIN, et. al., "Overexpression of O-linked N-Acetylglucosamine Transferase (OGT) triggers Apoptosis", Molecular Biology of the cell, 2002, Vol. 13. Supple., 304a-305a, 1712

文献4：F. R. WETTEY et. al., "Controlled Elimination of Clathrin Heavy-Chain Expression in DT40 Lymphocytes", Science, 2002, Vol. 297, p. 1521-1525

文献5：K. ODA et. al., "p53AIP1, a Potential Mediator of p53-Dependent Apoptosis, and Its Regulation by Ser-46-Phosphorylated p53", Cell, 2000, Vol. 102, p. 849-862

請求の範囲1-3に記載される発明は、文献1-5より、新規性、進歩性を有する。

文献1には、転写因子であるp53のSer46がリン酸化されることにより癌細胞がアポトーシスを起こすこと、p53のSer46がPheに置換された変異体が様々な癌腫において優位にアポトーシス誘導を示すこと、これら転写因子を癌治療に使用することが記載されている。

文献2には、転写因子であるp53のSer46がリン酸化されることにより細胞のアポトーシスが誘導されることが記載されている。

文献3には、OGTの過剰発現によりアポトーシスが起こること、OGTがN-アセチルグルコサミンを制御タンパク(p53等の転写因子)と構造タンパク(クラスリン集合タンパクAP3等)の、両者のセリン残基、トレオニン残基に結合させることができることが記載されている。

文献4には、天然のクラスリン遺伝子を不活性化させ、ヒト由来のクラスリン重鎖cDNAを導入して得られた鳥由来細胞を用い、ヒト由来のクラスリンの発現が抑制されることにより、アポトーシスが引き起こされたことが記載されている。

文献5には、p53により発現が誘導されるp53AIP1遺伝子が記載されており、当該遺伝子が発現することによりアポトーシスが起こること、p53のSer46がリン酸化されることによりアポトーシスが誘起されること、Ser46を置換することにより、p53がアポトーシスを引き起こす能力が阻害されること、p53AIP1の発現を選択的に抑制することが記載されている。

配列表に関する補充欄

第I欄2. の続き

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際予備報告を作成した。

- a. タイプ 配列表
 配列表に関するテーブル
- b. フォーマット 書面
 コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる
 この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された
 出願後に、調査又は予備審査のために、この国際機関に提出された
 _____ 付けて、この国際予備審査機関が補正*として受理した
2. さらに、配列表又は配列表に関するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 棚足意見：

*第I欄4. に該当する場合、差替える配列表又は配列表に関するテーブルに "superseded" と記入されることがある。

補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

第 V 欄の続き

しかし、文献1－5には、p 53又はその変異体にクラスリンのHCを併用することにより、癌細胞でのアポトーシスを高めるという効果（本願の第9図に示されている効果である。）が記載も示唆もされておらず、またこの点は当業者にとって自明とも認められない。

なお、phRG-TKは、ウミシイタケluciferaseを発現するプラスミド（Promega社、内部コントロール）を示す。トランスフェクションの方法はInvitrogen社のキットに添付されているプロトコールに従った。

表1

pcDNA3.1あるいはpcDNA-p53-f p53AIP1pro.reporter phRG-TK	30 ng 100 ng 10 ng	
Total	140 ng	
OPTI-MEM	25 µl	Lipo溶液

DNA溶液

- 3) DNA溶液とLipo溶液を混和し、室温で30分間インキュベーションした。
- 4) そのDNA-liposome複合体を1)で調製した細胞に滴下した。
- 5) 4時間後、DNA-liposome複合体を除去し、細胞を1 X PBSで洗浄した。
- 6) トランスフェクションしてから24時間後、細胞を1 X PBSで洗浄し、Dual luciferase assay kit (Promega社) を用いて、細胞中のホタルluciferase活性及びウミシイタケluciferase活性（内部コントロール）をそれぞれルミノメーターで測定した。その測定方法は、Promega社のキットに添付されているプロトコールに従って行った。
- 7) pcDNA3.1を導入した細胞抽出液中のホタルluciferase活性をウミシイタケluciferase活性で割った値を1とした時の相対的な活性（Fold Activation）を算出した。

その結果を第5図に示す。p53のSer46Phe置換体はp53A1P1プロモーターからの転写を野生型よりもかなり強く誘導することがわかった。

試験例5

この試験例では、試験例1で用意した5種の発現ベクターをヒト非小肺がん由来細胞にトランスフェクトし、その細胞抽出物を調べた。

試験は以下の手順で行った。

- 1) 9×10^6 のH1299細胞（非小肺がん由来）を15 cm ディッシュに蒔き、一晩培養した（10枚）。

9) その後、1.5 mg/ml FLAG ペプチドを含む上記細胞溶解緩衝液で競合的にビーズから p53 タンパク質溶出した。

10) その溶出画分を SDS-PAGE 次いで銀染色した。

その結果を第6図に示す。その結果、S46F置換体ではp53と一緒に分子量170 kDaのタンパク質が強く共沈澱してくる。これをマススペクトロメトリにかけてみたところ、LHIIEVGTPPTGNQPFPK、IVLDNSVFSEHR、VANVELYYR、QLPLVKPYLR、及びVDKLDASESLR（配列番号3～7）のアミノ酸配列が得られた。これらは、それぞれクラスリン重鎖（配列番号2）の228-245、1011-1022、1398-1406、1444-1453、及び1610-1620位に相当する。これは、この170 kDaのタンパク質がクラスリンの重鎖であることを示す。

11) 170 kD のタンパク質の同定には銀染色で使われた量の約20倍のタンパク質を濃縮し、SDS-PAGE 次いでCBB染色、目的バンドの切り出し、トリプシン消化後、質量分析を用いて行った。

12) 10) の実験手順で得られた溶出液の100分の1容をSDS-PAGE 次いでPVDF膜に転写後、抗クラスリン重鎖抗体（Transduction Laboratories）あるいは抗p53抗体（Santa Cruz）を用いたウエスタンブロッティング法を行った。ここではAmersham社のhorseradish peroxidase-抗マウスIgG二次抗体とECLキットを用いてバンドを視覚化した。

その結果を第7図に示す。S46F置換体にクラスリン重鎖が特に強く結合することがわかった。

試験例6

この試験例では、試験例5で用いたヒト非小肺がん由来細胞の核抽出物を調べた。試験は以下の手順で行った。

1) 15 cm ディッシュ一枚分を試験例5と同様の手順でトランスフェクションした。

2) 細胞を回収後、1 ml の表4の低張緩衝液＊1で細胞を懸濁し、ホモジナイザーで細胞膜を破壊した。

表4

低張緩衝液*1

10 mM HEPES-KOH (pH7.9)	10 µg/ml antipain
10 mM KCl	10 µg/ml pepstatin
1.5 mM MgCl ₂	10 µg/ml chymostatin
0.5 mM DTT	10 µg/ml leupeptin
1 mM Na ₃ VO ₄	10 µg/ml E64
50 mM NaF	10 µg/ml PMSF

高張緩衝液*2

25 mM HEPES-KOH (pH7.9)	10 µg/ml antipain
420 mM KCl	10 µg/ml pepstatin
10 % glycerol	10 µg/ml chymostatin
0.1 mM DTT	10 µg/ml leupeptin
1 mM Na ₃ VO ₄	10 µg/ml E64
50 mM NaF	10 µg/ml PMSF

- 3) それを 600 × g、5 分間、4°Cで低速遠心し、細胞質画分と核画分に分離した。
- 4) 核画分に関しては 2)、3) の操作を 2 回繰り返し、核画分に細胞質由来のタンパク質の持ち込みができる限り除去した。
- 5) 核画分を 0.2 ml の表 4 の高張緩衝液*2 で懸濁し 30 分間氷上に置き、核からタンパク質を溶出した。
- 6) 10 k × g、5 分間、4 °Cで核画分から不溶性画分を除去した。
- 7) 細胞質画分と核画分由来のタンパク質を SDS-PAGE 次いで PVDF 膜に転写後、抗クラスリン重鎖抗体を用いた試験例 5 と同様にウエスタンブロッティング法を行った。核画分は細胞質に比べ 5 倍量の細胞由来のタンパク質を用いた。その結果を第 8 図に示す。この結果、クラスリンは細胞質でのみ働くと思われていたが、クラスリン重鎖の一部分は核内にも存在することを確認した。

実施例 1

請求の範囲

1. (補正後) p 5 3又はその1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された変異 p 5 3、及びクラスリン重鎖から成る転写因子を有効成分とする癌の治療薬。
2. (補正後) 前記変異 p 5 3が、少なくとも46位のS e rが置換されたp 5 3である請求項1に記載の癌の治療薬。
3. (補正後) 前記変異 p 5 3が、その46位のS e rがP h eに置換されている請求項2に記載の癌の治療薬。
4. (削除)
5. (補正後) p 5 3又はその1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された変異 p 5 3、及びクラスリン重鎖から成る転写因子、又はクラスリン重鎖を癌細胞に注入することから成る癌の治療法。
6. (追加) 前記変異 p 5 3が、少なくとも46位のS e rが置換されたp 5 3である請求項1に記載の癌の治療法。
7. (追加) 前記変異 p 5 3が、その46位のS e rがP h eに置換されている請求項2に記載の癌の治療法。